

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-128691

(P2003-128691A)

(43)公開日 平成15年5月8日(2003.5.8)

(51)Int.Cl.⁷
C 0 7 H 21/04
1/08
21/02
C 1 2 M 1/00
1/40

識別記号

F I
C 0 7 H 21/04
1/08
21/02
C 1 2 M 1/00
1/40

テマコード*(参考)
A 2 G 0 4 5
2 G 0 5 4
4 B 0 2 4
A 4 B 0 2 9
B 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数39 O L (全 24 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002-201106(P2002-201106)

(71)出願人 000005201

富士写真フィルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地

(22)出願日 平成14年7月10日(2002.7.10)

(72)発明者 森 寿弘

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フィルム株式会社内

(31)優先権主張番号 特願2001-233858(P2001-233858)

(72)発明者 竹下 由美子

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フィルム株式会社内

(32)優先日 平成13年8月1日(2001.8.1)

(74)代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

(33)優先権主張国 日本 (JP)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の分離精製方法

(57)【要約】

【課題】 検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法に使用する、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を使用した核酸の分離精製方法、及びその方法を実施するのに適した核酸分離精製ユニットを提供する。

【解決手段】 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む核酸の分離精製方法、及び少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニット。

(2)

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む、核酸の分離精製方法。

【請求項2】 表面に水酸基を有する有機高分子がアセチルセルロースの表面鉱化物である、請求項1に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項3】 表面に水酸基を有する有機高分子がトリアセチルセルロースの表面鉱化物である、請求項1または2に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項4】 アセチルセルロースの表面鉱化率が5%以上である、請求項2または3に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項5】 アセチルセルロースの表面鉱化率が10%以上である、請求項2または3に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項6】 アセチルセルロースが多孔膜である、請求項2から5の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項7】 アセチルセルロースが非孔性膜である、請求項2から5の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項8】 アセチルセルロースがビーズにコーティングされている、請求項2から7の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項9】 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に、試料溶液中の核酸を吸着及び脱着させる、請求項1から8の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項10】 試料溶液が、細胞又はウイルスを含む検体を核酸可溶化試薬で処理して得られた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である、請求項9に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項11】 核酸可溶化試薬が、グアニジン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素である、請求項10に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項12】 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着させた後、核酸洗浄バッファを用いて固相を洗浄し、次いで固相に吸着した核酸を脱着せしめうる液を用いて固相に吸着した核酸を脱着させる工程を含む、請求項1から11の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項13】 核酸洗浄バッファが、メタノール、エタノール、イソプロパノール又はn-ブロパノールを20~100重量%含む溶液である、請求項12に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項14】 固相に吸着した核酸を脱着せしめうる液が、塩濃度が0.5M以下の溶液である、請求項12または13に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項15】 少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う、請求項1から14の何れかに記載の核酸の分離

精製方法。

【請求項16】 (a) 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う、請求項1から15の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項17】 以下の工程を含む、請求項16に記載の核酸の分離精製方法。

10 (a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口を上記の核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、

(b) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸を含む試料溶液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(c) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸を含む試料溶液を容器外に排出する工程、

20 (d) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸洗浄バッファ中に挿入する工程、

(e) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸洗浄バッファを吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

(f) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸洗浄バッファを容器外に排出する工程、

(g) 核酸分離精製ユニットの一の開口を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液中に挿入する工程、

(h) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を吸引し、固相に接触させる工程、及び

30 (i) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を容器外に排出する工程。

【請求項18】 以下の工程を含む、請求項16に記載の核酸の分離精製方法。

(a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記の核酸を含む試料溶液を注入する工程、

(b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、

50

(3)

3

- (c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に核酸洗浄バッファを注入する工程、
- (d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、
- (e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を注入する工程、
- (f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめる液を上記他の開口より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、容器外に排出する工程。

【請求項19】 少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニット。

【請求項20】 (a) 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相、

(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び

(c) 前記容器の一の開口に結合された、圧力差発生装置、を含む核酸分離精製ユニット。

【請求項21】 前記圧力差発生装置が、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている、請求項20に記載の核酸分離精製ユニット。

【請求項22】 前記圧力差発生装置が注射器である請求項20に記載の核酸分離精製ユニット。

【請求項23】 前記圧力差発生装置がピペットである請求項20に記載の核酸分離精製ユニット。

【請求項24】 前記圧力差発生装置がポンプである請求項20に記載の核酸分離精製ユニット。

【請求項25】 ビーズにアセチルセルロースをコーティングした後表面酸化する、アセチルセルロースに水酸基を導入する方法。

【請求項26】 表面酸化により水酸基が導入されたアセチルセルロース膜を表面に有するビーズ。

【請求項27】 (1) 請求項1から18の何れかに記載の方法によりターゲット核酸断片を含む核酸断片を分離精製する工程；

(2) 前記ターゲット核酸断片、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼを反応させ、前記ターゲット核酸断片を鑄型にした前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応を行う工程；及び、

(3) ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイ

10

4

ブリダイゼーションの有無を検出する工程：を含む、核酸の分析方法。

【請求項28】 ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロ磷酸を検出することによりポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出する、請求項27に記載の核酸の分析方法。

【請求項29】 比色法を用いてピロ磷酸の検出を行う、請求項28に記載の核酸の分析方法。

【請求項30】 乾式分析素子を用いてピロ磷酸の検出を行う、請求項28または29に記載の核酸の分析方法。

【請求項31】 乾式分析素子が、ピロ磷酸を無機磷に変換する試薬、および無機磷の量に応じた発色反応を行う試薬群を含有する試薬層を備えるピロ磷酸定量用乾式分析素子である、請求項30に記載の核酸の分析方法。

【請求項32】 乾式分析素子が、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備えるピロ磷酸定量用乾式分析素子である、請求項31に記載の核酸の分析方法。

【請求項33】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択される、請求項27から32のいずれかに記載の核酸の分析方法。

【請求項34】 ピロ磷酸の検出を、ピロ磷酸を酵素的に無機磷に変換した後、次いでキサントシンまたはイノシン、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備える無機磷定量用乾式分析素子を用いて行う、請求項28又は29に記載の核酸の分析方法。

【請求項35】 ピロ磷酸を無機磷に変換する酵素が、ピロホスファターゼである、請求項34に記載の核酸の分析方法。

【請求項36】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素（リバーストランスクリプターゼ）からなるグループから選択される、請求項34又は35に記載の核酸の分析方法。

【請求項37】 核酸の分析が、ターゲット核酸断片の存在または存在量の検出あるいはターゲット核酸断片の塩基配列の検出である、請求項27から36の何れかに記載の核酸の分析方法。

【請求項38】 ターゲット核酸断片の塩基配列の検出が、ターゲット核酸断片の変異または多型の検出である、請求項37に記載の核酸の分析方法。

【請求項39】 (1) 請求項12から17の何れかに記載の核酸分離精製ユニットを含む核酸の抽出・精製を行うための手段、(2) ポリメラーゼ伸長反応を行うた

50

(4)

5

めの反応手段、および(3)ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出するための手段、を含む請求項27から38の何れかに記載の核酸の分析方法を行うための分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸を分離精製する方法、核酸分離精製ユニット、及びこれらを用いた核酸の分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現における種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】広く知られた精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の表面に吸着させ、引き続く洗浄、脱着等の操作によって精製する方法がある（例えば、特公平7-51065号公報）。この方法は、分離性能としては優れているが、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法を提供することである。本発明の別の目的は、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である固相を使用した核酸の分離精製方法、及びその方法を実施するのに適した核酸分離精製ユニットを提供することである。本発明のさらには別の目的は、上記した核酸の分離精製方法を利用した核酸の分析方法を提供することである。本発明のさらには別の目的は、特殊な技術、複雑な操作、および特殊な装置

6

を必要とせずに、簡便かつ迅速に小型の装置を用いて実施することのできる核酸断片の分析方法、即ち、省スペースで自動化が可能な核酸断片の分析方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、核酸を固相に吸着及び脱着させる過程を含む核酸の分離精製方法において、前記固相として表面に水酸基を有する有機高分子を使用し、二個の開口を有する容器内に上記固相を収容した核酸分離精製ユニットを使用することによって、核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を分離することができるを見出した。さらに、上記方法で分離した核酸を用いたポリメラーゼ伸長反応の際に生成するピロ磷酸を、乾式分析素子を用いて検出することによって、特殊な装置を必要とせずに、簡便性、迅速性に優れた核酸の分析を行えることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0008】即ち、本発明によれば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む、核酸の分離精製方法が提供される。本発明の別の側面によれば、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットが提供される。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、ビーズにアセチルセルロースをコーティングした後表面鹹化する、アセチルセルロースに水酸基を導入する方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、表面鹹化により水酸基が導入されたアセチルセルロース膜を表面に有するビーズが提供される。本発明のさらに別の側面によれば、(1)上記した本発明の方法によりターゲット核酸断片を含む核酸断片を分離精製する工程；(2)前記ターゲット核酸断片、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼを反応させ、前記ターゲット核酸断片を錫型にした前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応を行う工程；及び、(3)ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出する工程：を含む、核酸の分析方法が提供される。

【0010】本発明のさらに別の側面によれば、(1)上記した本発明の核酸分離精製ユニットを含む核酸の抽出・精製を行うための手段、(2)ポリメラーゼ伸長反応を行うための反応手段、および(3)ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出するための手段、を含む本発明の核酸の析方法を行うための分析装置が提供される。

50

(5)

7

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

(1) 本発明の核酸の分離精製方法

本発明の核酸の分離精製方法は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含むことを特徴とする。本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0012】表面に水酸基を有する有機高分子としては、アセチルセルロースの表面酸化物が好ましい。アセチルセルロースしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースの何れでもよいが、特にはトリアセチルセルロースが好ましい。本発明では、表面酸化したアセチルセルロースを固相として使用することが好ましい。ここで表面酸化とは、酸化処理液（例えば、NaOH）が接触する表面だけが酸化されることを言う。本発明では、固相の構造体はアセチルセルロースのままで、固相の表面だけが酸化されていることが好ましい。これにより、表面酸化処理の程度（表面酸化度）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。

【0013】表面に水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするために、表面に水酸基を有する有機高分子を膜化することが好ましい。また、アセチルセルロースは多孔膜でも非孔性膜でもよいが、膜を多孔性とすることが更に好ましい。固相が多孔性膜の場合、膜の構造体はアセチルセルロースのままで、構造体の表面だけを酸化することが好ましい。これにより、表面酸化処理の程度（表面酸化度）×孔径により空間的な水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。また、膜の構造体はアセチルセルロースから構成されているため、堅固な固相を得ることができる。ここで、アセチルセルロースを表面酸化して表面にのみ水酸基を導入するということは、構造体はアセチルセルロースのままで、表面をセルロース化するということを意味する。なお、セルロースを原材料として用いると、液体にできないため、工業的に多孔膜や平膜を製造することはできない。

【0014】例えば、トリアセチルセルロースの膜は、商品名TACベースとして富士写真フィルムから市販されており、トリアセチルセルロースの多孔膜としては、ミクロフィルターFM500（富士写真フィルム（株）製）がある。また、例えばポリエチレン製のビーズの表面にトリアセチルセルロースの膜を形成し、これを表面酸化して表面に水酸基を持たせることも好ましい。この場合、トリアセチルセルロースはビーズにコーティングされることになる。ビーズの素材は、核酸を汚染等しなければよく、ポリエチレンには限定されない。

【0015】核酸の分離効率を挙げるためには、水酸基の数が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロ

8

ースなどのアセチルセルロースの場合には、表面酸化率が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。アセチルセルロースを表面酸化するには、水酸化ナトリウム水溶液中に、表面酸化したい対象を浸漬する。表面酸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えればよい。表面酸化率は、NMRにより、残存アセチル基を定量して定められる。

【0016】本発明の核酸の分離精製方法では、好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0017】さらに好ましくは、(a) 表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0018】この場合の本発明の核酸の分離精製方法の第一の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

(a) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、(b) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸を含む試料溶液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、(c) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸を含む試料溶液を容器外に排出する工程、(d) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸洗浄バッファ溶液中に挿入する工程、(e) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸洗浄バッファ溶液を吸引し、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、(f) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸洗浄バッファ溶液を容器外に排出する工程、(g) 核酸分離精製ユニットの一の開口を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめる液中に挿入する工程、(h) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を吸引し、固相に接触させる工程、及び(i) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめる液を容器外に排出する工程。

【0019】本発明の核酸の分離精製方法の第二の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

50 (a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、核酸

(6)

9

分離精製ユニットの一の開口に上記の核酸を含む試料溶液を注入する工程、(b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、(c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に核酸洗浄バッファを注入する工程、(d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記他の開口より排出することによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させる工程、(e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、(f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着された核酸を脱着させ、容器外に排出する工程。

【0020】表面に水酸基を有する有機高分子を用いた核酸の分離精製方法についてさらに具体的に説明する。本発明では、好ましくは、核酸を含む試料溶液を表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に接触させることにより試料溶液中の核酸を固相に吸着させ、次いで、固相に吸着させた核酸を、以下に説明する好適な溶液を用いて固相から脱着させる。さらに好ましくは、核酸を含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を細胞膜及び核膜を溶解する溶液で処理することにより核酸を液中に分散させた溶液に水溶性有機溶媒を添加した溶液である。

【0021】本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0022】最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散する。細胞膜の溶解および核酸の可溶化のために、例えば、対象となる試料が全血の場合、①赤血球の除去、②各種タンパク質の除去、及び③白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。①赤血球の除去および②各種タンパク質の除去は、固相への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、③白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化するためにそれぞれ必要となる。特に、③白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程

(6)

10

で核酸を可溶化することが必要である。本明細書中以下に記載の実施例では、塩酸グアニン、T r i t o n-X 1 0 0、プロテアーゼK (S I G M A製) を添加した状態で60℃で10分インキュベートすることによって上記の①、②及び③を同時に達成している。

【0023】本発明で用いる核酸可溶化試薬としては、グアニン塩、界面活性剤およびタンパク質分解酵素を含む溶液が挙げられる。グアニン塩としては、塩酸グアニンが好ましいが、他のグアニン塩（イソチオシアニ酸グアニン、チオシアニ酸グアニン）を使用することもできる。グアニン塩の溶液中の濃度は、0.5M以上6M以下 好ましくは 1M以上5M以下である。

【0024】界面活性剤としてはT r i t o n-X 1 0 0を使用することができるが、この他にも、S D S、コール酸ナトリウム又はサルコシンナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、T w e e n 2 0 又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル (T r i t o n-X 1 0 0) 等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

【0025】タンパク質分解酵素としては、プロテアーゼKを使用することはできるが、他のプロテアーゼでも同様の効果を得ることができる。プロテアーゼは酵素であるため加温するのが好ましく、37℃～70℃で使用することが好ましく、特に50℃～65℃で使用することが好ましい。

【0026】このように核酸が分散した水溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、表面に水酸基を有する有機高分子と接触させる。この操作により、試料溶液中の核酸が表面に水酸基を有する有機高分子に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化された核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着させるためには、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することが必要である。

【0027】即ち、核酸の周りに存在する水分子の水和構造を破壊することにより、核酸は不安定な状態で可溶化することになる。この状態の核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相と接触させると、核酸表面上の極性基と固相表面の極性基間で相互作用し、核酸は固相表面上に吸着するものと考えられる。本発明の方法では、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することによって、核酸を不安定な状態にさせることができる。

【0028】ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙

(7)

11

げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

【0029】得られた核酸混合液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解および核酸の可溶化の効果を併有するので特に好ましい。

【0030】次いで、この核酸が吸着した表面に水酸基を有する有機高分子を核酸洗浄バッファ溶液に接触させる。この溶液は核酸と一緒に表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、表面に水酸基を有する有機高分子から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなる。主剤としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-イソプロパノール、ブタノール、アセトン等の約10～100重量%（好ましくは約20～100重量%、さらに好ましくは約40～80重量%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エタノール、Triton及びTriton-X100を含む溶液が好ましい。Triton及びTriton-X100の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～10重量%である。

【0031】次に、表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめる溶液に、上記洗浄後の表面に水酸基を有する有機高分子を接触させる。この溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。核酸を脱着せしめる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

【0032】(2) 本発明の核酸分離精製ユニット

本発明の核酸分離精製ユニットは、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットである。容器の材料に特別な限定はないが、表面に水酸基を有する有機高分子が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸エステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは

(7)

12

不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

【0033】容器の概念図を図1に示す。基本的には、固相の収容部を持ち、収容部に固相を収容でき、固相が試料液等の吸引及び排出時に収容部の外へは出ることがなく、開口に圧力差発生装置、例えば注射器を接合できればよい。このためには、容器が当初は二つの部分に分かれており、固相を収容した後で一体化できることが好ましい。また、固相が収容部から外へでることをさける為には、固相の上下にDNAを汚染しない材料で作成されたメッシュを置くことができる。

【0034】上記容器に収容される表面に水酸基を有する有機高分子の形状にも特別な限定は無く、円形、正方形、長方形、楕円、膜の場合には筒状、巻物状、あるいは表面に水酸基を有する有機高分子をコーティングしたビーズ等、任意の形状で良いが、製造適性の点からは、円、正方形、円筒状、巻物状等の対称性の高い形状及びビーズが好ましい。

【0035】上記容器の一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入し、他の一の開口から吸引して表面に水酸基を有する有機高分子に試料溶液を接触させ、これを排出し、次いで核酸洗浄バッファ溶液を吸引・排出し、次いで、表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめる溶液を吸引・排出して、この排出液を回収することにより、目的とする核酸を得ることができる。

【0036】表面に水酸基を有する有機高分子を、核酸を含む試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液、及び表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめる溶液中に順次浸漬しても目的とする核酸を得ることができる。

【0037】本発明の核酸分離精製ユニットは、(a)表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相、(b)前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c)前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置、を含むものであることが好ましい。以下、この核酸分離精製ユニットについて説明する。

【0038】容器は、通常、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容する本体と、蓋体に分けた様で作製され、いずれにも少なくとも1個の開口が設けられている。一方は核酸を含有する試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液及び固相に吸着された核酸を脱着せしめる液（以下、「試料溶液等」と記す。）の入口及び出口として使用され、他方は容器内を減圧又は加圧状態にせしめる圧力差発生装置に接続される。本体の形状に特に限定はないが、製造が容易で、試料溶液等が固相の全面に拡散し易くするには、断面を円形にすることが好ましい。断面を四角形にすることも、固相の裁断屑を発生させないために好ましい。

【0039】上記蓋は、圧力差発生装置によって容器内部を減圧及び加圧状態にできるように本体に接合されて

(8)

13

いる必要があるが、この状態が達成できれば、接合方法は任意に選択できる。例えば、接着剤の使用、ねじ込み、はめ込み、ネジ止め、超音波加熱による融着等が挙げられる。

【0040】容器の内容積は処理すべき試料溶液の量のみによって決められるが、通常、収容される固相の体積で表す。即ち、厚さが約1mm以下（例えば、50～500μm程度）で、直径が約2mm～20mmの固相を1枚～6枚程度収容する大きさとすることが好ましい。

【0041】固相の端面は、試料溶液等が通過しない程度に、容器の内壁面に密着させることが好ましい。

【0042】試料溶液等の入り口に使用される開口に対向する固相の下は、容器の内壁に密着させずに空間を設け、試料溶液等が固相の全面にできるだけ均等に拡散する構造にする。

【0043】他の一の開口、即ち圧力差発生装置に結合される開口に対向する固相の上には、ほぼ中央に穴を穿った部材を設けることが好ましい。この部材は、固相を押さえると共に、試料溶液等を効率よく排出する効果を有するものであり、液が中央の穴に集まる様に、漏斗状あるいはお椀状等の斜面を有する形状にすることが好ましい。この穴の大きさ、斜面の角度、部材の厚さは、処理する試料溶液等の量や固相を収容する容器の大きさ等を考慮して、当業者が適宜定めることができる。この部材と当該開口の間には、オーバーフローした試料溶液等を溜めて、圧力差発生装置内に吸引されることを防ぐための空間を設けることが好ましい。この空間の大きさも当業者が適宜選択することができる。なお、核酸を効率良く集めるためには、固相の全体が浸る以上の量の核酸を含む試料溶液を吸引することが好ましい。

【0044】また、吸引している開口の真下の部分にのみ試料溶液等が集中することを防いで、試料溶液等が固相内を比較的均一に通過できるようにするために、固相とこの部材の間にも空間を設けることが好ましい。このためには、当該部材から固相に向けて複数の突起物を設けることが好ましい。突起物の大きさや数は当業者が適宜選択することができるが、空間を保持しながら固相の開口面積をできる限り大きく保つことが好ましい。

【0045】なお、容器に3以上の開口を設けた場合には、減圧及び加圧操作に伴う液の吸引及び排出を可能にすべく、余分の開口を一時的に封鎖する必要があることはいうまでもない。

【0046】圧力差発生装置は、まず固相を収容した容器内を減圧にして核酸を含む試料溶液を吸引する。圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような吸引及び加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、前記容器の一の開口に着脱可能に結合さ

(8)

14

れている。

【0047】次に、上記した核酸分離精製ユニットを使用した、核酸の精製方法について説明する。先ず、核酸を含む試料溶液中に、上記の核酸分離精製ユニットの一の開口を挿入する。次いで他の一の開口に接続された圧力差発生装置を用いて精製ユニットの内部を減圧にして試料溶液を容器内に吸引する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中にある核酸が固相に吸着する。この際に、固相のほぼ全体と接触する量の試料溶液を吸引することが好ましいが、圧力差発生装置内に吸引すると装置を汚染するので、適量に調整する。

【0048】適量の試料溶液を吸引後、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した液を排出する。この操作までに間隔を開ける必要はなく、吸引後直ちに排出してもよい。

【0049】次に、上記と同様の減圧一加圧操作で核酸洗浄バッファ溶液を容器内に吸引し、これから排出して容器内部を洗浄する。この溶液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。従って、固相から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなり、主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約10～90%（好ましくは約50～90%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、Tri s 及び Triton-X100 を含む溶液が好ましい。

【0050】次に、固相に吸着した核酸を脱着せしめる溶液を、上記と同様の減圧一加圧操作によって容器内部に導入し、容器から排出する。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供することができる。

【0051】図2は、本発明の核酸分離精製ユニットの一例の断面図である。但し圧力差発生装置は図示していない。固相を収容する容器1は、本体10と蓋20から成り、透明なポリスチレンで形成されている。本体10は固相30として表面酸化したトリアセチルセルロースの膜を収容している。また、試料溶液等を吸引する開口101を有する。開口から続いている底面102は漏斗状に形成され、固相30との間に空間121が設けられている。固相30を支えて空間121を保つために、底面102と一体となった枠103が設けられている。

【0052】本体は、内径が20.1mm、深さが5.9mm、底面102から開口101までの長さは約70

(9)

15

mmである。また、内蔵されている固相30の直径は20.0 mm、一枚の厚さは約50～500 μmであり、厚さの一例としては100 μmである。

【0053】図2において、固相の上部には漏斗状の押さえ部材13が設けられている。押さえ部材13の中央には穴131があり、かつ下方に一群の突起132が設けられ、固相30との間に空間122が設けられている。固相30と本体10の壁104の間から試料溶液等が漏れにくい様に、壁104の上部の直径は固相の直径より大きく作成され、段差105の上に押さえ部材13の端が乗っている。

【0054】蓋20は本体10と超音波加熱により接合されている。蓋20のほぼ中央部には、圧力差発生装置を結合する開口21が設けられている。蓋20と押さえ部材13の間には、穴131から流出する試料溶液等を保持する空間123が設けられている。空間123の容積は約0.1 m³である。

【0055】(3) 本発明の核酸の分析方法

本発明の核酸の分析方法は、(1) 上記した本発明の方法によりターゲット核酸断片を含む核酸断片を分離精製する工程；(2) 前記ターゲット核酸断片、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リシン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼを反応させ、前記ターゲット核酸断片を鋳型にした前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応を行う工程；及び、(3) ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出する工程：を含むことを特徴とするものである。

【0056】本発明の好ましい態様によれば、ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロ磷酸を検出することによりポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出する。さらに好ましい態様は、ピロ磷酸の分析を比色法を用いて行う方法であり、より好ましくは、ピロ磷酸の検出を乾式分析素子を用いて行う方法である。本発明による核酸の分析方法では、ターゲット核酸断片の存在または存在量を検出したり、あるいはターゲット核酸断片の塩基配列を検出することができる。なお、ここで言う存在量の検出とは、ターゲット核酸断片の定量を含む概念である。ターゲット核酸断片の塩基配列の検出の具体例としては、ターゲット核酸断片の変異または多型の検出などが挙げられる。図3に、本発明の実施形態を説明する概念図を示す。

【0057】本発明に係るターゲット核酸断片の分析方法の第一の好ましい形態を以下に列記する。

(イ) ピロ磷酸の検出を、キサントシンまたはイノシン、ピロホスファターゼ、プリンヌクレオシドホスホリーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備えることを特徴とするビ

(9)

16

ロ磷酸定量用乾式分析素子を用いて行う。

(ロ) ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素(リバーストランスクリプターゼ)からなるグループから選択されるポリメラーゼを用いる。

【0058】さらに、本発明の別の態様では、ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無の検出を前記ポリメラーゼ伸長反応に伴って生成するピロ磷酸を検出することにより行う際に、ピロ磷酸の検出を、ピロ磷酸を酵素的に無機磷に変換した後、次いでキサントシンまたはイノシン、プリンヌクレオシドホスホリーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及び発色剤を含有する試薬層を備える無機磷定量用乾式分析素子を用いて行うことができる。この場合の好ましい形態を以下に列記する。

(イ) ピロ磷酸を変換する酵素として、ピロホスファターゼを用いる。

(ロ) ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素(リバーストランスクリプターゼ)からなるグループから選択されるポリメラーゼを用いる。

【0059】以下、本発明の核酸の分析方法について更に詳細に説明する。

(A) ターゲット核酸断片：本発明において分析の対象となるターゲット核酸断片とは、少なくとも一部の塩基配列が既知であるプリンヌクレオチドであり、動物、微生物、細菌、植物などすべての生物から単離されるゲノミックDNA断片が対象となり得る。またウイルスから単離可能なRNA断片またはDNA断片、およびmRNAを鋳型として合成されたcDNA断片も対象とすることが可能である。ターゲット核酸断片はできる限り精製され、核酸断片以外の余分な成分が取り除かれていることが望ましい。例えば、動物(例えば人間)の血液から単離したゲノミックDNA断片を対象とする場合または血液中に存在する感染細菌やウイルスの核酸(DNAまたはRNA)断片を対象とする場合、単離の過程で破壊された白血球細胞膜、赤血球中から溶出したヘモグロビン、および血液中に存在するその他の一般化学物質は、十分に取り除いておく必要がある。特にヘモグロビンは、続いておこなうポリメラーゼ伸長反応を阻害する。また血液中に一般生化学物質として存在するピロ磷酸や磷酸は、ポリメラーゼ伸長反応により生成するピロ磷酸の正確な検出の妨害要因になる。

【0060】(B) ターゲット核酸断片と相補的なプライマー：本発明において使用するターゲット核酸断片と相補的なプライマーは、ターゲット核酸断片の塩基配列が既知である目的の部位に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。このターゲット核酸断片と相補的なプライマーがターゲット核酸断片の目的の

(10)

17

部位にハイブリダイゼーションすることで、プライマーの3'末端を起点に、ターゲット核酸を鋳型としポリメラーゼ伸長反応が進行する。即ち、本発明においてはプライマーがターゲット核酸断片の目的の部位を認識して特異的にハイブリダイゼーションするか否かがポイントとなる。本発明で使用するプライマーの好ましい塩基数は5~60塩基である。特に好ましくは15~40塩基である。プライマーの塩基数は少なすぎると、ターゲット核酸断片の目的の部位との特異的性が低下するだけでなく、ターゲット核酸断片とのハイブリッド自体が安定に形成できない。また、プライマーの塩基数は多すぎると、プライマー間またはプライマー内で塩基間の水素結合により2本鎖を形成してしまい、やはり特異性が低下する。

【0061】本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の存在を検出する場合、ターゲット核酸断片の異なる部位に対して、それぞれの部位に相補的なプライマーを複数使用することも可能である。このようにターゲット核酸断片を複数の部位で認識することで、ターゲット核酸断片の存在の検出において、特異性が向上する。また、ターゲット核酸断片の一部を増幅（例えばPCR法）する場合には、その増幅法に応じて複数のプライマーを設計することも可能である。本発明の方法を用いてターゲット核酸断片の塩基配列を検出する場合、特に変異または多型の有無を検出する場合は、目的の変異または多型の部分を含むように、変異または多型に対応する塩基の種類でプライマーを設計する。そうすることで、ターゲット核酸断片の変異または多型の有無により、ターゲット核酸断片へのプライマーのハイブリダイゼーションの有無に差異が生じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することが可能になる。また、変異または多型に対応する部分をプライマーの3'末端付近に設定することでポリメラーゼの反応部位の認識に差異が生じ、結果的にポリメラーゼ伸長反応の差異として検出することも可能である。

【0062】(C) ポリメラーゼ：本発明において使用するポリメラーゼは、ターゲット核酸がDNAの場合は、ターゲット核酸断片の一本鎖に変性された部分にプライマーがハイブリダイゼーションすることで形成された2本鎖の部分を起点として、5'→3'の方向に、デオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)を材料として、ターゲット核酸断片を鋳型にして相補的な伸長反応を触媒するDNAポリメラーゼである。具体的に使用されるDNAポリメラーゼとしては、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、Bst DNAポリメラーゼ等がある。DNAポリメラーゼは目的に応じて選択または組み合わせることが可能である。例えば、ターゲット核酸断片の一部を増幅（例えばPCR法）する場合には、耐熱性に優れたTaq DNAポリメラーゼを用いることが有効である。また、「BIO

18

INDUSTRY, Vol. 18, No. 2, 2001」に記載されている増幅法（LAMP法：Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA）を用いてターゲット核酸断片の一部を増幅する場合には、5'→3'方向へのヌクレアーゼ活性がなく、かつ鋳型上の2本鎖DNAを1本鎖DNAとして遊離させながら伸長反応を触媒する鎖置換型のDNAポリメラーゼとして、Bst DNAポリメラーゼを使用することが有効である。その他、目的に応じて、3'→5'方向へのヘキソキナーゼ活性を持つ、DNAポリメラーゼα、T4 DNAポリメラーゼ、及びT7 DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0063】また、RNAウイルスのゲノミック核酸またはmRNAがターゲット核酸断片である場合には、逆転写活性を有するリバーストランスクリプターゼを使用することが可能である。さらにリバーストランスクリプターゼとTaq DNAポリメラーゼを併用することも可能である。

【0064】(D) ポリメラーゼ伸長反応：本発明において対象となるポリメラーゼ伸長反応には、前記(A)に記載されているようなターゲット核酸断片の1本鎖に変性された部分の一部に特異的にハイブリダイゼーションした、前記(B)に記載されているようなターゲット核酸断片と相補的なプライマーの3'末端を起点として、デオキシヌクレオシド3リン酸(dNTP)を材料として、前記(C)に記載されているようなポリメラーゼを触媒として、ターゲット核酸断片を鋳型にして進行する相補的な核酸の伸長反応の全てが含まれる。この相補的な核酸の伸長反応とは、少なくとも2回（2塩基分）、連続しての伸長反応が起こることをさしている。

【0065】以下に、例として代表的なポリメラーゼ伸長反応、およびポリメラーゼ伸長反応を伴うターゲット核酸断片の目的部位の増幅反応の例を示す。ターゲット核酸断片を鋳型にして、5'→3'の方向へのポリメラーゼ伸長反応を一度だけ行う場合が最も単純である。このポリメラーゼ伸長反応は等温の条件で実施することができる。この場合には、ポリメラーゼ伸長反応の結果として生成するピロ磷酸の量は、最初のターゲット核酸断片の量に比例する。即ち定量的にターゲット核酸断片の存在を検出するのに適した方法である。

【0066】ターゲット核酸の量が少ない場合は、ポリメラーゼ伸長反応を利用した何らかの手段でターゲット核酸の目的部分を増幅することが好ましい。ターゲット核酸の増幅には、これまで開発、発明してきた各種の方法を使用することができる。ターゲット核酸の増幅法で最も一般的で普及している方法はPCR（ポリメラーゼチェーンリアクション）法である。PCR法では、反応液の温度の上げ下げを周期的にコントロールすることにより、変性（核酸断片を2本鎖から1本鎖に変性する

(11)

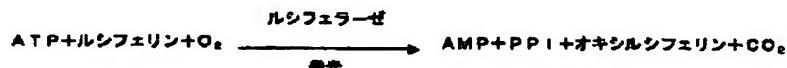
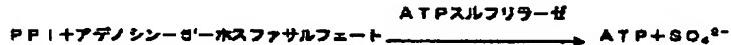
19

工程) → アニーリング (1本鎖に変性した核酸断片にプライマーをハイブリダイズさせる工程) → ポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼ) 伸長反応 → ディネイチヤーの周期的な工程を繰り返すことで、ターゲット核酸断片の目的部分を増幅する方法である。最終的に、ターゲット核酸断片の目的部位は初期量の100万倍にも増幅し得る。そのためPCR法の増幅過程でのポリメラーゼ伸長反応で生成するピロ磷酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。

【0067】特開平5-130870号公報に記載されている、エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法もポリメラーゼ伸長反応を利用した、ターゲット核酸断片の目的部位の増幅法の一つである。この方法はターゲット核酸断片の目的部位に特異的にハイブリダイゼーションしたプライマーを起点とした、ポリメラーゼ伸長反応とともに、5' → 3' エクソヌクレアーゼを作用させて、プライマーを逆方向から分解する方法である。分解したプライマーの代わりに新たなプライマーがハイブリダイゼーションし、再度DNAポリメラーゼによる伸長反応が進行する。このポリメラーゼによる伸長反応と、この先に伸長した鎖を外すエクソヌクレアーゼによる分解反応が順次、周期的に繰り返される。ここで、ポリメラーゼによる伸長反応とエクソヌクレアーゼによる分解反応は等温条件で実施することが可能である。このサイクリングアッセイ法においても繰り返されるポリメラーゼ伸長反応で生成するピロ磷酸の蓄積量も多くなり、検出が容易になる。

【0068】近年開発されたターゲット核酸断片の目的部位の増幅法として、前記LAMP法がある。この方法は、ターゲット核酸断片の少なくとも6個所の特定部位³⁰

(式1)



【0072】本発明に適したピロ磷酸の検出方法は式2または式3に示した方法である。式2または式3に示した方法は、ピロ磷酸 (PP_i) をピロホスファターゼで無機磷 (Pi) に変換し、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) により無機磷 (Pi) をキサントシンまたはイノシンと反応させ、生じたキサンチンまたはヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼ (XOD) により酸化して尿酸を生成させ、この酸化過程で生じる過酸

(11)

20

*を相補的に認識する少なくとも4種のプライマーと、5' → 3' 方向へのスクレアーゼ活性がなく、かつ鋳型上の2本鎖DNAを1本鎖DNAとして遊離させながら伸長反応を触媒する鎖置換型のBst DNAポリメラーゼを使用することで、等温条件でターゲット核酸断片の目的部位を、特別な構造として増幅する方法である。このLAMP法の増幅効率は高く、ポリメラーゼ伸長反応で生成するピロ磷酸の蓄積量も非常に多くなり、検出が容易になる。

【0069】ターゲット核酸断片がRNA断片の場合には、逆転写活性を有するリバーストランスクリプターゼを使用し、RNA鎖を鋳型にして伸長反応を行うことが可能である。さらにリバーストランスクリプターゼとTaq DNAポリメラーゼを併用し、RT (リバーストランスクリプション) 反応に引き続いてPCR反応を行う、RT-PCR法を用いることができる。このRT反応またはRT-PCR反応で生成するピロ磷酸を検出することで、ターゲット核酸断片のRNA断片の存在を検出することができる。この方法は、RNAウイルスの存在を検出する場合に有効である。

【0070】(E) ピロ磷酸 (PP_i) の検出：従来からピロ磷酸 (PP_i) の検出法としては、式1に示された方法が知られている。この方法では、ピロ磷酸 (PP_i) をスルフリラーゼによりアデノシン3'磷酸 (ATP) に変換し、アデノシン3'磷酸がルシフェラーゼによりルシフェリンに作用して生じる発光を検出する。そのため、この方法でピロ磷酸 (PP_i) を検出するには発光を測定できる装置が必要である。

【0071】

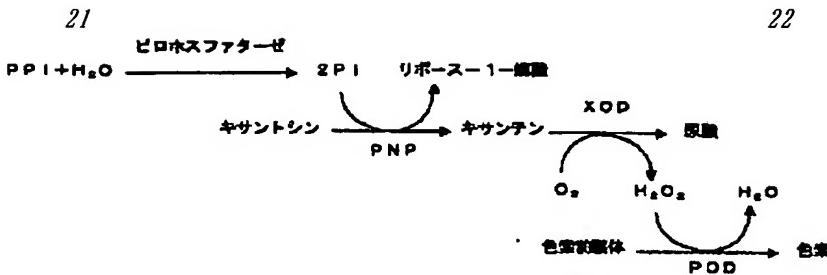
【化1】

化水素 (H₂O₂) を用いてペルオキシダーゼ (POD) により発色剤 (色素前駆体) を発色させ、これを比色するものである。これら式2または式3に示した方法では結果を比色で検出できるため、目視または簡単な比色測定装置を用いてピロ磷酸 (PP_i) の検出が可能である。

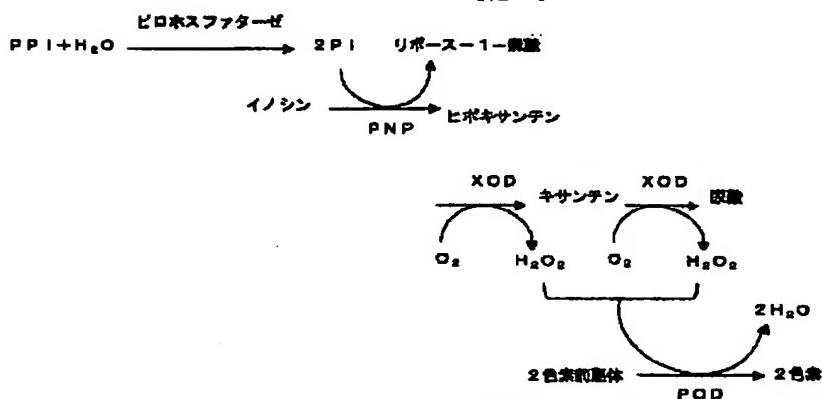
【0073】

【化2】

(12)



【0074】



【0075】ビロホスファターゼ (EC 3, 6, 1, 1) プリンヌクレオシドホリラーゼ (PNP, EC 2, 4, 2, 1)、キサンチンオキシダーゼ (XOD, EC 1, 2, 3, 2) 及びペルオキシダーゼ (POD, EC 1, 11, 1, 7) は市販のものを使用することができる。発色剤 (すなわち色素前駆体) は、過酸化水素とペルオキシダーゼ (POD) により色素を生成させるものであればよく、例えば、ロイコ色素の酸化によって色素を生成する組成物 (例、米国特許 4, 089, 747 等に記載のトリアリールイミダゾールロイコ色素、特開昭59-193352号公報 (EP 0122641 A) 等に記載のジアリールイミダゾーロイコ色素) ; 酸化されたときに他の化合物とカップリングにより色素を生成する化合物を含む組成物 (例えば4-アミノアンチピリン類とフェノール類又はナフトール類) などを使用することができる。

【0076】(F) 乾式分析素子：本発明において使用することのできる乾式分析素子とは、一層または複数層の機能層からなる分析素子であって、その少なくとも一層 (または複数の層に渡って) に検出試薬を含有させ、層内での反応により生じた生成色素を、分析素子の外から反射光あるいは透過光により比色定量するものである。

【0077】このような乾式分析素子を用いて定量分析するには、液体試料を展開層の表面に一定量点着する。展開層で展開された液体試料は試薬層に達し、ここで試薬と反応し、発色する。点着後、乾式分析素子を適当な時間、一定温度に保って (インクベーション) 発色反応を充分に進行させた後、例えば透明支持体側から照明光を試薬層に照射し、特定波長域で反射光量を測定して反射光学濃度を求め、予め求めておいた検量線に基づいて

20 定量分析を行う。

【0078】乾式分析素子においては、検出を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

【0079】(G) ビロ磷酸定量用乾式分析素子：本発明で使用することのできるビロ磷酸定量用乾式分析素子は、公知の多種の乾式分析素子と同様の層構成とすることができます。乾式分析素子は、前記 (E) 項 (ビロ磷酸 (PPI) の検出) における、式2または式3の反応を行うための試薬の他、支持体、展開層、検出層、光遮蔽層、接着層、吸水層、下塗り層その他の層を含む多重層としてもよい。このような乾式分析素子として、例えば特開昭49-53888号公報 (対応米国特許 3, 992, 158)、特開昭51-40191号公報 (対応米国特許 4, 042, 335)、及び特開昭55-164356号公報 (対応米国特許 4, 292, 272)、特開昭61-4959号公報 (対応 EPC 公開特許 0166365 A) の各明細書に開示されたものがある。

【0080】本発明で用いることができる乾式分析素子としては、ビロ磷酸を無機磷に変換する試薬、および無機磷の量に応じた発色反応を行う試薬群を含有する試薬層を備えるビロ磷酸定量用乾式分析素子が挙げられる。このビロ磷酸定量用乾式分析素子においては、ビロホスファターゼを用いて酵素的にビロ磷酸 (PPI) を無機磷 (Pi) に変換するまでは本明細書中上記した通り行うことができ、それ以降は、生化学検査分野で既知の以下に述べる「無機磷の定量法」 (及びそれらに用いられ

(13)

23

る各反応の組み合わせ) を用いることにより、無機燐 (P i) の量に応じた発色反応を行うことができる。【0081】なお、「無機燐」を表記する場合、燐酸(燐酸イオン)として、「P i」と表記する場合と「H PO₄²⁻、H₂PO₄¹⁻」と表記する両方の場合がある。以下に示す反応の例では、「P i」として表記するが、同じ反応式に対して「H PO₄²⁻」と表記する場合もある。

【0082】無機燐の定量法としては酵素法と燐モリブデン酸塩法が知られている。以下、無機燐の定量法としての酵素法と燐モリブデン酸塩法について説明する。

【0083】A. 酵素法

P i を定量検出するための一連の反応における最後の「呈色反応」に用いる酵素に応じて、ペルオキシダーゼ (POD) を用いる方法とグルコースー6-燐酸デヒドロゲナーゼ (G 6 PDH) を用いる方法がある。以下、これらの方の具体例を説明する。

【0084】(1) ペルオキシダーゼ (POD) を用いる方法の例

(1-1) 無機燐 (P i) を、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) により、イノシンと反応させ、生じたヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼ (XOD) により酸化して尿酸を生成する。この酸化過程で生じる過酸化水素 (H₂O₂) を用いて、ペルオキシダーゼ (POD) により、4-アミノアンチピリン (4-AA) とフェノールとを酸化縮合させてキノンイミン色素を形成し、これを比色する。

【0085】(1-2) 無機燐 (P i) 、コカルボキシラーゼ (TPP) 、フラビンアデニジヌクレオチド (FAD) 、Mg²⁺の存在下で、ビルビン酸をビルビン酸オキシダーゼ (POP) により酸化してアセチル酢酸を生成する。この酸化過程で生じる過酸化水素 (H₂O₂) を用いて、上記 (1-1) の場合と同様に、ペルオキシダーゼ (POD) により、4-アミノアンチピリン (4-AA) とフェノールとを酸化縮合させてキノンイミン色素を形成し、これを比色する。

【0086】なお、上記の (1-1) および (1-2) における最後の呈色反応は、過酸化水素の検出試薬として既知の「Trinder 試薬」を使用して行うことができる。この反応で、フェノールは「水素供与体」として働く。「水素供与体」として用いるフェノールは古典的で、現在は改良された様々な「水素供与体」が使用されている。このような水素供与体の具体例としては、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニリジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、及びN-スルホプロピルアニリンなどが挙げられる。

10

【0087】(2) グルコースー6-燐酸デヒドロゲナーゼ (G 6 PDH) を用いる方法

(2-1) 無機燐 (P i) とグリコーゲンとをホスホリラーゼを用いて反応させ、グルコースー1-燐酸 (G-1-P) を生成させる。生じたグルコースー1-燐酸をホスホグルコムターゼ (PGM) により、グルコースー6-燐酸 (G-6-P) にする。グルコースー6-燐酸とニコチアミドアデニジヌクレオチド (NAD) との存在下、グルコースー6-燐酸デヒドロゲナーゼ (G 6 PDH) により、NADを還元してNADHにし、これを比色する。

【0088】(2-2) 無機燐 (P i) とマルトースとをマルトースホスホリラーゼ (MP) を用いて反応させ、グルコースー1-燐酸 (G-1-P) を反応させる。以下、上記 (2-1) と同様に、生じたグルコースー1-燐酸をホスホグルコムターゼ (PGM) により、グルコースー6-燐酸 (G-6-P) にする。グルコースー6-燐酸とニコチアミドアデニジヌクレオチド (NAD) との存在下、グルコースー6-燐酸デヒドロゲナーゼ (G 6 PDH) により、NADを還元してNADHにし、これを比色する。

30

【0089】B. 燐モリブデン酸塩法

酸性下で無機燐(燐酸塩)と水溶性モリブデン酸イオンとを錯化させた「燐モリブデン酸塩(H₃[PO₄Mo₁₂O₃₆])」を直接定量する「直接法」と、上記直接法の反応に続いて、還元剤により、Mo (IV) からMo (II) として、モリブデン青 (Mo (III)) を定量する「還元法」とがある。水溶性モリブデン酸イオンの例としては、モリブデン酸アルミニウム、モリブデン酸カドミウム、モリブデン酸カルシウム、モリブデン酸バリウム、モリブデン酸リチウム、モリブデン酸カリウム、モリブデン酸ナトリウム、モリブデン酸アンモニウムなどが挙げられる。還元法で使用される代表的な還元剤の例としては、1, 2, 4アミノナフトールスルホン酸、硫酸第一鉄アンモニウム、塩化第一鉄、塩化第一スズヒドラジン、硫酸-p-メチルアミノフェノール、N, N-ジメチルフェニレンジアミン、アスコルビン酸、マラカイトグリーンなどが挙げられる。

【0090】光透過性水不透過性支持体を用いる場合の乾式分析素子は、実用的に次のような構成を取り得る。ただし、本発明の内容はこれに限定されない。

50

(14)

25

- (1) 支持体上に試薬層を有するもの。
- (2) 支持体上に検出層、試薬層をこの順に有するもの。
- (3) 支持体上に検出層、光反射層、試薬層をこの順に有するもの。
- (4) 支持体上に第2試薬層、光反射層、第1試薬層をこの順に有するもの。
- (5) 支持体上に検出層、第2試薬層、光反射層、第1試薬層をこの順に有するもの。

【0091】上記(1)ないし(3)において試薬層は異なる複数の層から成ってもよい。例えば第1試薬層には、式2または式3に示すピロホスファターゼ反応に必要な酵素ピロホスファターゼ、PNP反応に必要な基質キサントシンまたは基質イノシンと酵素PNPを、第2試薬層には、式2または式3に示すXOD反応に必要な酵素XODを、そして第3試薬層には、式2または式3に示すPOD反応に必要な酵素PODと発色色素(色素前駆体)を、それぞれ含有させてもよい。あるいは試薬層を2層として、第1試薬層ではピロホスファターゼ反応とPNP反応を、第2試薬層ではXOD反応とPOD反応を進行させてもよい。又は、第1試薬層ではピロホスファターゼ反応とPNP反応とXOD反応を、第2試薬層でPOD反応を進行させてもよい。

【0092】なお支持体と試薬層又は検出層との間には吸水層を設けてもよい。また各層の間には濾過層を設けてもよい。また試薬層の上には展開層を設けてもよく、その間に接着層を設けてもよい。

【0093】支持体は光不透過性(不透明)、光半透過性(半透明)、光透過性(透明)のいずれのものも用いることができるが、一般的には光透過性で水不透過性の支持体が好ましい。光透過性水不透過性支持体の材料として好ましいものはポリエチレンテレフタート、ポリスチレンである。親水性層を強固に接着させるため通常、下塗り層を設けるか、親水化処理を施す。

【0094】試薬層として多孔性層を用いる場合、その多孔性媒体は繊維質であってもよいし、非繊維質であってもよい。繊維質材料としては、例えば濾紙、不織布、織物布地(例えば平織り布地)、編物布地(例えばトリコット編物布地)、ガラス繊維濾紙等を用いることができる。非繊維質材料としては特開昭49-53888号公報等に記載の酢酸セルロースなどからなるメンブランフィルター、特開昭49-53888号公報、特開昭55-90859号公報(対応米国特許4,258,001)特開昭58-70163号公報(対応米国特許4,486,537)等に記載の無機物又は有機物微粒子からなる連続空隙含有粒状構造物層等のいずれでもよい。特開昭61-4959号公報(対応欧州公開EP0166365A)、特開昭62-116258号公報、特開昭62-138756号公報(対応欧州公開EP0226465A)、特開昭62-138757号公報

26

(対応欧州公開EP0226465A)、特開昭62-138758号公報(対応欧州公開EP0226465A)等に記載の部分接着された複数の多孔性層の積層物も好適である。

【0095】多孔性層は、供給される液体の量にほぼ比例した面積に液体を展開する、いわゆる計量作用を有する展開層であってもよい。展開層としては、これらのうち織物布地、編物布地などが好ましい。織物布地などは特開昭57-66359号公報に記載されたようなグローフ放電処理をしてもよい。展開層には、展開面積、展開速度等を調節するため特開昭60-222770号公報(対応:EP0162301A)、特開昭63-219397号公報(対応西獨特許公開DE3717913A)、特開昭63-112999号公報(対応:DE3717913A)、特開昭62-182652号公報(対応:DE3717913A)に記載したような親水性高分子あるいは界面活性剤を含有させてもよい。

【0096】例えば紙、布、高分子からなる多孔質膜等に本発明の試薬を予め含浸又は塗布した後、支持体上に設けた他の水浸透性層、例えば検出層の上に、特開昭55-1645356号公報のような方法で接着させるのも有用な方法である。

【0097】こうして作られる試薬層の厚さは特に制限されないが、塗布層として設ける場合には、1μm~50μm程度、好ましくは2μm~30μmの範囲が適當である。ラミネートによる積層など、塗布以外の方法による場合、厚さは数十μmから数百μmの範囲で大きく変化し得る。

【0098】親水性ポリマーバインダーからなる水浸透性層で試薬層を構成する場合、使用できる親水性ポリマーとしては、例えば、以下のものがある。ゼラチン及びこれらの誘導体(例えばフタル化ゼラチン)、セルロース誘導体(例えばヒドロキシエチルセルロース)、アガロース、アルギン酸ナトリウム、アクリルアミド共重合体やメタアクリルアミド共重合体(例えば、アクリルアミド又はメタアクリルアミドと各種ビニル性モノマーとの共重合体)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸ナトリウム、アクリル酸と各種ビニル性モノマーとの共重合体などである。

【0099】親水性ポリマーバインダーで構成される試薬層は、特公昭53-21677号公報(対応米国特許3,992,158)、特開昭55-164356号公報(対応米国特許4,292,272)、特開昭54-101398号公報(対応米国特許4,132,528)等の明細書に記載の方法に従って本発明の試薬組成物と親水性ポリマーを含む水溶液又は分散液を支持体又は検出層等の他の層の上に塗布し乾燥することにより設けることができる。親水性ポリマーをバインダーとする試薬層の乾燥時の厚さは約2μm~約50μm、好ま

(15)

27

しくは約4 μm～約30 μmの範囲、被覆量では約2 g/m²～約50 g/m²、好ましくは約4 g/m²～約30 g/m²の範囲である。

【0100】試薬層には式2または式3の試薬組成物の他に、塗布特性、拡散性化合物の拡散性、反応性、保存性等の諸性能の向上を目的として、酵素の活性化剤、補酵素、界面活性剤、pH緩衝剤組成物、微粉末、酸化防止剤、その他、有機物あるいは無機物からなる各種添加剤を加える事ができる。試薬層に含有させることができる緩衝剤はの例としては、日本化学会編「化学便覧基礎」(丸善(株)、1966年発行)1312-1320頁、R. M. C. Dawson et al編、「Data for Biochemical Research」第2版(Oxford at the Clarendon Press, 1969年発行)476-508頁、「Biochemistry」5, 467-477頁(1966年)、「Analytical Biochemistry」104, 300-310頁(1980年)に記載のpH緩衝剤系がある。pH緩衝剤系の具体例として硼酸塩を含む緩衝剤；クエン酸又はクエン酸塩を含む緩衝剤；グリシンを含む緩衝剤；ビシン(Bicine)を含む緩衝剤；HEPESを含む緩衝剤；MESを含む緩衝剤などのグッド緩衝剤等がある。なお磷酸塩を含む緩衝剤は、ピロ磷酸検出用乾式分析素子に使用することはできない。

【0101】本発明で使用することのできる、ピロ磷酸定量用乾式分析素子は前述の諸特許明細書に記載の公知の方法により調製することができる。ピロ磷酸定量用乾式分析素子は一辺約5 mmから約30 mmの正方形またはほぼ同サイズの円形等の小片に裁断し、特公昭57-283331号公報(対応米国特許4, 169, 751)、実開昭56-142454号公報(対応米国特許4, 387, 990)、特開昭57-63452号公報、実開昭58-32350号公報、特表昭58-501144号公報(対応国際公: WO 083/00391)等に記載のスライド枠に収めて化学分析スライドとして用いることが製造、包装、輸送、保存、測定操作等の観点で好ましい。使用目的によっては、長いテープ状でカセットまたはマガジンに収めて用いたり、又は小片を開口のある容器内に収めて用いたり、又は小片を開口カードに貼付または収めて用いたり、あるいは裁断した小片をそのまま用いることなどもできる。

【0102】本発明で使用することのできるピロ磷酸定量用乾式分析素子は前述の諸特許明細書等に記載の操作と同様の操作により液体試料中の被検物であるピロ磷酸の定量検出ができる。例えば約2 μL～約30 μL、好ましくは4 μL～15 μLの範囲の水性液体試料液を試薬層に点着する。点着した分析素子を約20℃～約45℃の範囲の一定温度で、好ましくは約30℃～約40℃の範囲内の一定温度で1～10分間インキュベーション

28

する。分析素子内の発色又は変色を光透過性支持体側から反射測光し、予め作成した検量線を用いて比色測定法の原理により検体中のピロ磷酸の量を求めることができる。点着する液体試料の量、インキュベーション時間及び温度を一定にすることにより定量分析を高精度に実施できる。

【0103】測定操作は特開昭60-125543号公報、特開昭60-220862号公報、特開昭61-294367号公報、特開昭58-161867号公報

(対応米国特許4, 424, 191)などに記載の化学分析装置により極めて容易な操作で高精度の定量分析を実施できる。なお、目的や必要精度によっては目視により発色の度合いを判定して、半定量的な測定を行ってよい。

【0104】本発明で使用することのできる、ピロ磷酸定量乾式分析素子においては、分析を行うまでは乾燥状態で貯蔵・保管されるため、試薬を用時調製する必要がなく、また一般に乾燥状態の方が試薬の安定性が高いことから、試薬溶液を用時調製しなければならないわゆる湿式法より簡便性、迅速性に優れている。また、微量の液体試料で、精度の高い検査を迅速に行うことができる検査方法としても優れている。

【0105】本発明の第二の形態において使用することのできる無機磷酸定量用乾式分析素子は、前記のピロ磷酸定量乾式分析素子における試薬層からピロホスファターゼを除くことで調製することができる。また、特開平7-197号公報に記載の乾式分析素子を使用すること也可能である。無機磷酸定量用乾式分析素子は、試薬層にピロホスファターゼを含有しない以外は、その層構成、製造方法、使用方法において、前記ピロ磷酸定量乾式分析素子と同様である。

【0106】(H) キット：本発明のターゲット核酸の分析は、分析するターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸(dNTP)、少なくとも一種のポリメラーゼ、及びピロ磷酸定量用乾式分析素子の各要素を含むキットを用いて実施することができる。

【0107】キットの形態は、少なくとも一部の塩基配列が既知であるターゲット核酸断片を含む液体を供給することのできる開口部、ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸(dNTP)、及び少なくとも一種のポリメラーゼを保持することのできる少なくとも一つの反応セル部、ピロ磷酸定量用乾式分析素子を保持することのできる検出部、及びそれら前記開口部、反応セル部、検出部の間を連結し、液体を移動させることのできる細管または溝を備えているカートリッジであってもよい。

【0108】このようなカートリッジとしては、米国特許5, 919, 711に記載されているカートリッジ等

(16)

29

を利用することができる。図4には、本発明におけるカートリッジ形態のキットの一例を示した。キット10において、開口部31からターゲット核酸を含有する試料液を供給することができる。開口部31は細管41によって、反応セル32と連結されている。反応セル32には、予めターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー81、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸(dNTP)82、及び少なくとも一種のポリメラーゼ83が保持されている。さらに、反応セル32は細管42によって検出部33と連結されている。検出部33には予め乾式分析素子51が保持されている。反応セル32でポリメラーゼ伸長反応が進行した試料液は、細管42を移動して、検出部33のピロ磷酸定量用乾式分析素子51上に供給され、ポリメラーゼ伸長反応により生成したピロ磷酸を検出する。上記キット10において、開口部31と反応セル32の間、及び反応セル32と検出部33の間の液体の移動は、遠心力、電気泳動または電気浸透などを用いることが可能である。また、反応セル32、細管41及び42、検出部33は、基体21と蓋22によって密封されていることが望ましい。

【0109】図4に示したようなカートリッジ形態のキット10を使用する場合、図5に示したように、反応セル32および検出部33の温度コントロール部61及び62と、ピロ磷酸定量用乾式分析素子51内の発色または色変化を反射光により検出することのできる検出部71及び72を備えている装置を合わせて使用することが望ましい。

【0110】本発明で使用することのできるカートリッジ形態のキットは、図4に示されているものに限らない。ポリメラーゼ伸長反応に必要な試薬はそれぞれ別のスペースに保持されていても良い。その場合は、反応時にそれぞれの試薬が反応セルに移動してくるようにすれば良い。また、反応セルは複数であっても良い。

【0111】ポリメラーゼ伸長反応で生成したピロ磷酸の検出を、ピロ磷酸を酵素的に無機磷に変換した後に無機磷定量用乾式分析素子を用いて行う場合には、第一の反応セルには、予めターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸(dNTP)、及び少なくとも一種のポリメラーゼを保持しておき、第一の反応セルにおいてポリメラーゼ伸長反応を行い、次いで、第一の反応セルと細管で連結されていて、予めピロホスファターゼが保持されている第二の反応セルに第一の反応セルでの反応液を移動させ、第一の反応セルにおけるポリメラーゼ伸長反応で生成したピロ磷酸を第二反応セルにおいて無機磷に変換し、次いで第二の反応セルでの反応液を、第二の反応セルに細管で連結されていて、予め無機磷定量用乾式分析素子が保持されている検出部に移動させ、無機磷を検出することも可能である。

30

【0112】また、1つのカートリッジ上に「開口部ー細管ー反応セルー細管ー検出部」の組を平行に並べて、または同心円の半径方向に並べて、複数組設置することも可能である。この場合、例えば反応セルに保持するターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマーの塩基配列を、ターゲットとする核酸の種類に応じて変更することで、同時に複数種のターゲット核酸を検出することが可能なキットを提供できる。

【0113】(4) 本発明の分析装置

10 さらに本発明は、上記した核酸の分析方法を行うための分析装置を提供する。該分析装置は、(1) 本明細書中上記した核酸分離精製ユニットを含む核酸の抽出・精製を行うための手段と、(2) ポリメラーゼ伸長反応を行うための反応手段と、(3) ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出するか、又はポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出するための手段とから構成される。

20 【0114】核酸の抽出・精製を行うための手段は、本明細書中上記した核酸分離精製ユニットから構成され、その他に、検体の液体をセットするスペース、核酸分離精製ユニットをセットするスペース、検体を一定温度(例えば、37°C)にインキュベートする手段、検体液又は処理液を吸引および排出するための手段などを備えることができる。

30 【0115】ポリメラーゼ伸長反応を行うための反応手段としては、PCRなどの核酸合成反応を行うことができる手段であり、一般的には、反応を行うための反応容器と、反応に必要な試薬を該反応容器中に添加する分注手段とから構成される。それ以外に、反応容器内の温度を調節するための温度調節手段(サーマルサイクラー又はインキュベーターなど)を備えることができる。分注手段により、核酸分離精製ユニットにより精製されたターゲット核酸断片を含む核酸断片、前記ターゲット核酸断片の一部と相補的な少なくとも一種のプライマー、少なくとも一種のデオキシヌクレオシド3'リン酸、及び少なくとも一種のポリメラーゼは反応容器中に添加され、前記ターゲット核酸断片を鋳型にした前記プライマーの3'末端を起点とするポリメラーゼ伸長反応が行われる。

40 【0116】ポリメラーゼ伸長反応の進行の有無を検出する手段としては、本明細書中上記したようなピロ磷酸定量用乾式分析素子または無機磷定量用乾式分析素子を使用することができる。その他、上記の乾式分析素子を一定温度にインキュベートする手段、及び乾式分析素子の発色を測定する反射測光装置を備えることができる。また、ポリメラーゼ伸長反応産物と他の核酸とのハイブリダイゼーションの有無を検出するための手段としては、ハイブリダイゼーションの有無の検出に用いられる通常の手段を使用することができる。本発明の分析装置(特に、ピロ磷酸定量用分析素子を用いる場合)は、分

(17)

31

離精製された核酸水溶液（の一部）をそのまま用いて次工程のポリメラーゼ伸長反応を実施でき、またポリメラーゼ伸長反応後の反応溶液（の一部）をそのまま用いて、次工程のピロ磷酸定量用分析素子による検出を実施できる（即ち、ポリメラーゼ伸長反応後の反応溶液をそのまま、ピロ磷酸定量用分析素子に点着できる）という特徴を有することから、システムの自動化に非常に好適である。以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0117】

【実施例】実施例1

(1) 核酸分離精製ユニット用容器の作成

内径7mm、厚さ2mmの核酸吸着用の固相を収容する*

調製した固相の特性

| 固相名 | 内 容 | 表面酸化率 | 固相の数又は形状 |
|-----|---------------------------------|-------|-----------|
| 固相A | ミクロフィルター FM500* | 0% | 1枚 |
| 固相B | 固相Aの表面酸化品 | 5% | 1枚 |
| 固相C | 固相Aの表面酸化品 | 10% | 1枚 |
| 固相D | 固相Aの表面酸化品 | 50% | 1枚 |
| 固相E | 固相Aの表面酸化品 | 100% | 1枚 |
| 固相F | トリアセチルセルロースベース** | 0% | 0.5mmの小片 |
| 固相G | 固相Fの表面酸化品 | 80% | 0.5mmの小片 |
| 固相H | ポリエチレンビーズ***にトリアセチルセルロースをコーティング | 0% | 0.3mmのビーズ |
| 固相I | 固相Hの表面酸化品 | 70% | 0.3mmのビーズ |

* 富士写真フィルム製 トリアセチルセルロース多孔膜

** 富士写真フィルム製 トリアセチルセルロースベース

*** 鎌淵化学製

【0119】(3) 核酸吸着バッファ溶液及び洗浄バッファ溶液の調製

表2に示す処方の核酸吸着バッファ溶液及び洗浄バッファ溶液を調製した。

【0120】

【表2】

核酸精製用吸着バッファ溶液及び洗浄バッファ溶液の処方

1. 核酸精製用バッファ溶液

| 成 分 | 量 |
|----------------------|--------|
| 塩酸グアニジン(ライフテクノロジー社製) | 382g |
| Tris(ライフテクノロジー社製) | 12.1g |
| Triton-X100(ICN製) | 10g |
| 2回蒸留水 | 1000ml |

2. 核酸洗浄用バッファ溶液

| 成 分 |
|------------------------|
| 10mM Tris-HCl 70%エタノール |

【0121】(4) 核酸精製操作

ヒト全血200μlを真空採血管を用いて採血した。これに、表2に示した処方の核酸吸着バッファ溶液200μlとプロテアーゼK20μl添加して、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール200μlを添加して攪拌した。攪拌後、上記の様に

32

* 部分を持つ、核酸分離精製ユニット用容器を、ハイインパクトポリスチレンで作成した。

(2) 核酸精製用固相及び核酸分離精製ユニットの作成
表1に示した核酸精製用固相及び比較用固相を作成した。表面酸化するためには、0.02N～2Nの水酸化ナトリウム水溶液中に表面酸化したい対象を20分間浸漬した。水酸化ナトリウムの濃度に応じて、表面酸化率が変わる。これらの固相を表1に示した量だけ、核酸分離精製ユニット用容器の固相収容部に収容して、核酸分離精製ユニットを作成した。

10 隔離精製ユニットを作成した。

【0118】

【表1】

処理した全血試料中に、(1)で作成した核酸分離精製ユニットの一の開口に接続した使い捨てのピペットチップの先端を挿入し、核酸分離精製ユニットの他の一の開口に接続した注射器を用いて、液を吸引し次いで排出した。

30 【0122】排出後直ちに、核酸洗浄バッファ溶液1ml中にピペットチップの先端を挿入し、液を吸引し次いで排出して、核酸分離精製ユニットの内部を洗浄した。洗浄後、200μlの精製蒸留水中にピペットチップの先端を挿入し、蒸留水を吸引し次いで排出して、この排出液を回収した。

【0123】(5) 核酸の回収量の定量及び純度の決定
上記回収した排出液の吸光度を測定して、核酸の回収量及び純度を定量した。回収量は波長260nmの光吸収測定により定量され、また、核酸の純度は260nm及び280nmでの光吸収の比率により決定され、この比率が1.8以上であれば純度は良好であると判断される。結果を表3に示す。この結果から、表面酸化率が5%以上のときにDNAの回収量が良好であり、かつ純度も高いことが判る。

40 【0124】

【表3】

(18)

33

34

使用した固相と核酸の回収量及び純度

| 固相名 | 内 容 | 品 表面酸化率 | 固相の数 又は形状 | 核 酸 回収量 (μg) | A260/ A280 |
|-----|-------------------------------------|------------|-----------------------|------------------------------------|---------------|
| 固相A | ミクロフィルター FM500* | 0% | 1枚 | 0. 1 | 測定不能 |
| 固相B | 固相Aの表面酸化品 | 5% | 1枚 | 1. 2 | 1. 814 |
| 固相C | 固相Aの表面酸化品 | 10% | 1枚 | 11. 2 | 1. 963 |
| 固相D | 固相Aの表面酸化品 | 50% | 1枚 | 16. 5 | 1. 882 |
| 固相E | 固相Aの表面酸化品 | 100% | 1枚 | 14. 6 | 1. 905 |
| 固相F | トリアセチルセルロースベース** | 0% | 0. 5mm ϕ の小 片 | 0 | 測定不能 |
| 固相G | 固相Fの表面酸化品 | 80% | 0. 5mm ϕ の小 片 | 5. 8 | 1. 898 |
| 固相H | ポリエチレンビーズ***にトリ アセチルセルロースをコーティング | 0% | 0. 3mm ϕ のビーズ | 0 | 測定不能 |
| 固相I | 固相Hの表面酸化品 | 70% | 0. 3mm ϕ のビーズ | 7. 2 | 1. 803 |

* 富士写真フィルム製 トリアセチルセルロース多孔膜

** 富士写真フィルム製 トリアセチルセルロースベース

*** 鏡面化字型

【0125】実施例2：表面酸化率100%のトリアセチルセルロース多孔膜を用いた全血試料からの核酸の精製

核酸吸着固相として表面酸化率100%のトリアセチルセルロース多孔膜（富士写真フィルム製）（実施例1の固相E）を使用して、実施例1と同様にして、全血試料から核酸を精製した。精製前の全血試料（5倍希釈してODを測定）および精製後ODを測定した。結果を図6に示す。図6の結果から、本発明の分離精製方法により核酸以外の成分が完全に除去されていることが分かる。

【0126】実施例3：核酸の増幅

実施例2にて精製された核酸を使用し、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸の増幅を実施した。ポジティブコントロールとして、クロンテック社製のHuman DNAを使用した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の反応液は、精製水（36.5 μl ）、10×PCRバッファー（5 μl ）、2.5mMのdNTP（4 μl ）、Taq F P（0.5 μl ）、プライマー（2 μl ）、サンプル（核酸）2 μl 。PCRは、94°Cで30秒の変性、65°Cで30秒のアニーリング、及び72°Cで1分の伸長反応を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返した。以下のプライマーを使用した。

【0127】1) p53エクソン6

フォワード：GCGCTGCTCA GATAGCGA
TG

リバース：GGAGGGCCAC TGACAAACC
A

【0128】2) p53エクソン10

フォワード：GATCCGTCAT AAAGTCAC
AC（配列番号1）

リバース：GGATGAGAAT GGAATCCT
AT（配列番号2）

【0129】3) ABO型遺伝子エクソン6

フォワード：CACCTGCAGA TGTGGGTG

GC ACCCTGCCA（配列番号3）

リバース：GTGGAATTCA CTCGCCAC
TG CCTGGGTCTC（配列番号4）

【0130】4) ABO型遺伝子エクソン7

フォワード：GTGGCTTTCC TGAAGCTG
20 TT C（配列番号5）

リバース：GATGCCGTTG GCCTGGTC
GA C（配列番号6）

【0131】PCRの反応産物を電気泳動した結果を図7に示す。インビトロジェンの100bpのマーカーを使用した。図7の結果から、本発明の方法で分離精製した核酸を使用したPCRにより所望の核酸を増幅できることが確認できた。

【0132】実施例4：核酸抽出－増幅（PCR）－検出（ピロ磷酸定量用乾式分析素子）によるヒト全血中の緑膿菌の検出（緑膿菌性敗血症の検査をモデルにした実験）

（1）緑膿菌を添加したヒト全血の調製

LB培地（Luria-Bertani medium）で一晩培養した緑膿菌（Pseudomonas Syringae）の培養液を元に、PBSによる希釈で濃度を変化させた溶液を、EDTA採血したヒト全血に添加することで、1mL当たりそれぞれ、0、5×10⁵、5×10⁶、2.5×10⁶、5×10⁷、1×10⁸の菌体個数を含む6水準のヒト全血を調製した。ここで、菌体個数は分光光度計を用いて見積もった値である。

【0133】（2）ピロ磷酸定量用乾式分析素子の作製
ゼラチン下塗層が設けられている厚さ180 μm の無色透明ポリエチレンテレフタレート（PET）平滑フィルムシート（支持体）上に表4記載の組成（a）の水溶液を、以下の被覆率となるように塗布し、乾燥して試薬層を設けた。

【0134】

【表4】

(19)

35

試薬層水溶液の組成(a)

| | |
|---|-------------------------|
| ゼラチン | 18.8 g/m ² |
| p-ノニルフェノキシポリキシドール (グリシドール単位: 平均10含有) (C ₉ H ₁₉ -Ph-O-(CH ₂ CH(OH)-CH ₂ -O) ₁₀ H) | 1.5 g/m ² |
| キサントシン | 1.96 g/m ² |
| ペルオキシダーゼ | 15000 IU/m ² |
| キサンチンオキシダーゼ | 13600 IU/m ² |
| プリンヌクレオシドホスホリラーゼ | 3400 IU/m ² |
| ロイコ色素 (2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-フェネチル-5-(4-ジメチルアミノフェニル)イミダゾール) | 0.28 g/m ² |
| 水 | 136 g/m ² |
| <u>(希NaOH溶液でpHを6,8に調整)</u> | |

【0135】この試薬層の上に下記の表5記載の組成(b)の接着層水溶液を以下の被覆率となるように塗布し、乾燥して接着層を設けた。

* 【0136】

【表5】

*

接着層水溶液の組成(b)

| | |
|---|-----------------------|
| ゼラチン | 3.1 g/m ² |
| p-ノニルフェノキシポリキシドール (グリシドール単位: 平均10含有) (C ₉ H ₁₉ -Ph-O-(CH ₂ CH(OH)-CH ₂ -O) ₁₀ H) | 0.25 g/m ² |
| 水 | 5.9 g/m ² |

【0137】次いで接着層の上に30 g/m²の割合で水を全面に供給してゼラチン層を膨潤させ、その上に純ポリエステル製のプロード織物布地をほぼ一様に軽く圧力をかけてラミネートして多孔性展開層を設けた。

※一塗布し、乾燥させ、13 mm×14 mmに裁断し、プラスチック製マウント材内に収めることで、ピロ磷酸定量用乾式分析素子を作成した。

【0139】

【表6】

【0138】次にこの展開層の上から下記の表6記載の組成(c)の水溶液を以下の被覆率となるようにほぼ均※

展開層水溶液の組成(c)

| | |
|---|-------------------------|
| HEPES | 2.3 g/m ² |
| スクロース | 5.0 g/m ² |
| ヒドロキシプロビルメチルセルロース (メトキシ基19~24%、ヒドロキシプロポキシ基4~12%) | 0.04 g/m ² |
| ピロフォスファターゼ | 14000 IU/m ² |
| 水 | 98.6 g/m ² |

(希NaOH溶液でpHを7,2に調整)

【0140】(3) ヒト全血からの核酸の抽出、精製
上記(1)で調製した緑膿菌を添加し調製した6水準のヒト全血を試料とし、そのそれぞれから、実施例2に記載の方法と同様の方法で核酸を抽出・精製することで、核酸水溶液を得た。6水準のヒト全血から得られた核酸量(分光光度計を用いて見積もった量)は20~30 ng/μlであった。得られた核酸水溶液はヒトのゲノム核酸と添加した緑膿菌のゲノム核酸の混合水溶液であり、大部分はヒトのゲノム核酸が占めている。

★ 【0142】<プライマー>緑膿菌のゲノム核酸に特異的(ice nucleation protein (Inak) N末端)な配列を持つ以下のプライマーセットを使用した。

プライマー(upper) ; 5'-GCGATGCTGTAAT
GACTCTCGACAAAGC-3' (配列番号7)

40 プライマー(lower) ; 5'-GGTCTGCAAATTCTGC
GGCGTCGTC-3' (配列番号8)

【0143】以下に示す反応液の組成で、[変性: 94°C・1分、アニーリング: 55°C・1分、ポリメラーゼ伸長反応: 72°C・1分]を30サイクル繰り返すことでPCR增幅を実施した。

★ 【0144】

【0141】(4) PCR增幅
上記(3)で、6水準のヒト全血試料から抽出・精製して得た核酸水溶液をそのまま用いて、以下の条件でPCR增幅を行った。

<反応液の組成>

| | |
|--------------------|------|
| 10 × PCRバッファー | 5 μL |
| 2.5 mM dNTP | 4 μL |
| 20 μM プライマー(upper) | 1 μL |

(20)

37
 20 μM プライマー(lower)
 Pyrobest
 (3) で得た核酸試料液
 精製水

【0145】(5)ピロ磷酸定量用分析素子を用いた検出前記(4)におけるPCR增幅反応後の溶液をそのまま、上記(2)で製作したピロ磷酸定量用乾式分析素子上に各々20 μL点着し、ピロ磷酸定量用乾式分析素子を37℃にて5分間インキュベーション後、波長650 nmにて支持体側から測定して得られた反射光学濃度(O_DR)を図8および図9に示した。

【0146】実施例4の結果より、緑膿菌を含むヒト全血より、本発明の核酸の分離精製方法に従って得たターゲット核酸断片を含む核酸試料液を、緑膿菌のゲノム核酸に特異的な配列を持つプライマーセットを使用しPCRを行い、そのPCR增幅反応後の溶液をそのまま用いて、生成したピロ磷酸を、ピロ磷酸定量用乾式分析素子*

SEQUENCE LISTING

<110> Fuji Photo Film Co. Ltd.,
<120> A method for the separation and purification of nucleic acid and a unit for the purification of nucleic acid
<130> A21274A
<160> 8

【0149】

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial DNA
<400> 1
gatccgtcat aaagtcaaac 20

【0150】

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial DNA
<400> 2
ggatgagaat ggaatcctat 20

【0151】

<210> 3
<211> 29 40
<212> DNA
<213> Artificial DNA
<400> 3
cacctgcaga tgtgggtggc accctgcc 29

【0152】

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial DNA
<400> 4 50

(20)

38
1 μL
0.25 μL
5 μL
3.75 μL

*を用いて反射光学濃度(O_DR)として測定することで、ヒト全血中に存在する緑膿菌の量に応じた反射光学濃度(O_DR)が得られることがわかる。

【0147】

【発明の効果】分離性能に優れ、洗浄効率が良く、加工が容易であり、実質的に同一の分離性能を有する物を大量に生産可能である固相を用いた、本発明の核酸の分離精製方法により、核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を分離することができる。更に本発明の核酸分離精製ユニットを使用すれば、操作が容易となる。

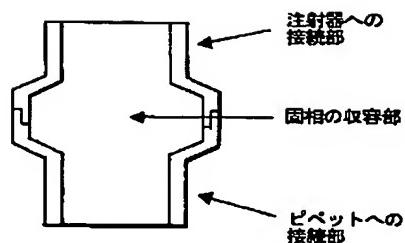
【0148】

【配列表】

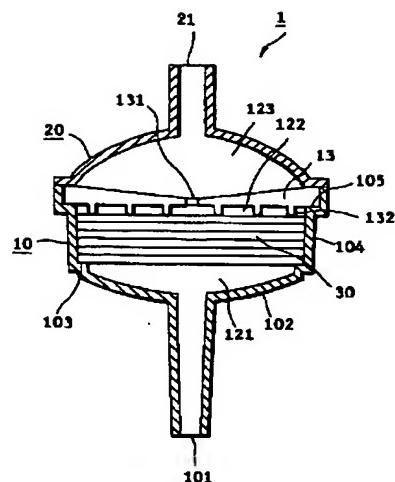
| | (21) | |
|------------|--|---|
| | 39 | |
| | gtggaaattca ctcgccactg cctgggttc | 30 |
| 【0153】 | | |
| | <210> 5 | |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial DNA | |
| | <400> 5 | |
| | gtggctttcc tgaagcttgtt c | 21 |
| 【0154】 | | |
| | <210> 6 | 10 |
| | <211> 21 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial DNA | |
| | <400> 6 | |
| | gatgccgttg gcctggtcga c | 21 |
| 【0155】 | | |
| | <210> 7 | |
| | <211> 27 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial DNA | 20 |
| | <400> 7 | |
| | gcgatgctgt aatgacttc gacaaggc | 27 |
| 【0156】 | | |
| | <210> 8 | |
| | <211> 25 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Artificial DNA | |
| | <400> 8 | |
| | ggtctgcaaa ttctggcg tcgtc | 25 |
| 【図面の簡単な説明】 | | |
| 【図1】 | 図1は、本発明の核酸分離精製ユニットの概念図である。 | |
| 【図2】 | 図2は、本発明の核酸分離精製ユニットの一例である。但し、開口21に結合されるべき圧力差発生装置は図示していない。図2において、1は容器、10は本体、101は開口、102は底面、103は枠、104は壁、105は段差、121は空間、122は空間、123は空間、13は押さえ部材、131は穴、132は突起、20は蓋、21は開口、30は固相を示す。 | |
| 【図3】 | 図3は、本発明の核酸の分析を説明する概念図である。 | |
| 【図4】 | 図4は、本発明で使用できるカートリッジ形態でのキットの例を示す斜視図である。図4において、10はキット、21は基体、22は蓋、31は開口部、32は反応セル、33は検出部、41及び42は細管、51は乾式分析素子、81はプライマー、82はデオキシ | |
| 30 | ヌクレオシド3'リン酸(dNTP)、83はポリメラーゼを示す。 | |
| | 【図5】 | 図5は、本発明のカートリッジ形態でのキットを使用する場合のシステム構成を示す斜視図である。図5において、10はキット、32は反応セル、33は検出部、61は温度コントロール部、62は温度コントロール部、71は検出部、72は検出部を示す。 |
| | 【図6】 | 図6は、表面酸化率100%のトリアセチルセルロース多孔膜を用いた全血試料からの核酸の精製の結果を示す図である。 |
| 40 | 【図7】 | 図7は、本発明の方法に従って分離精製した核酸を用いたPCR反応産物を電気泳動した結果を示す。 |
| | 【図8】 | 図8は、添加した緑膿菌個数と反射光学濃度(OD _R)の関係を示す。 |
| | 【図9】 | 図9は、添加した緑膿菌個数と反射光学濃度(OD _R)の関係を示す。 |

(22)

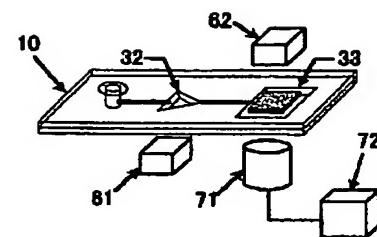
【図1】



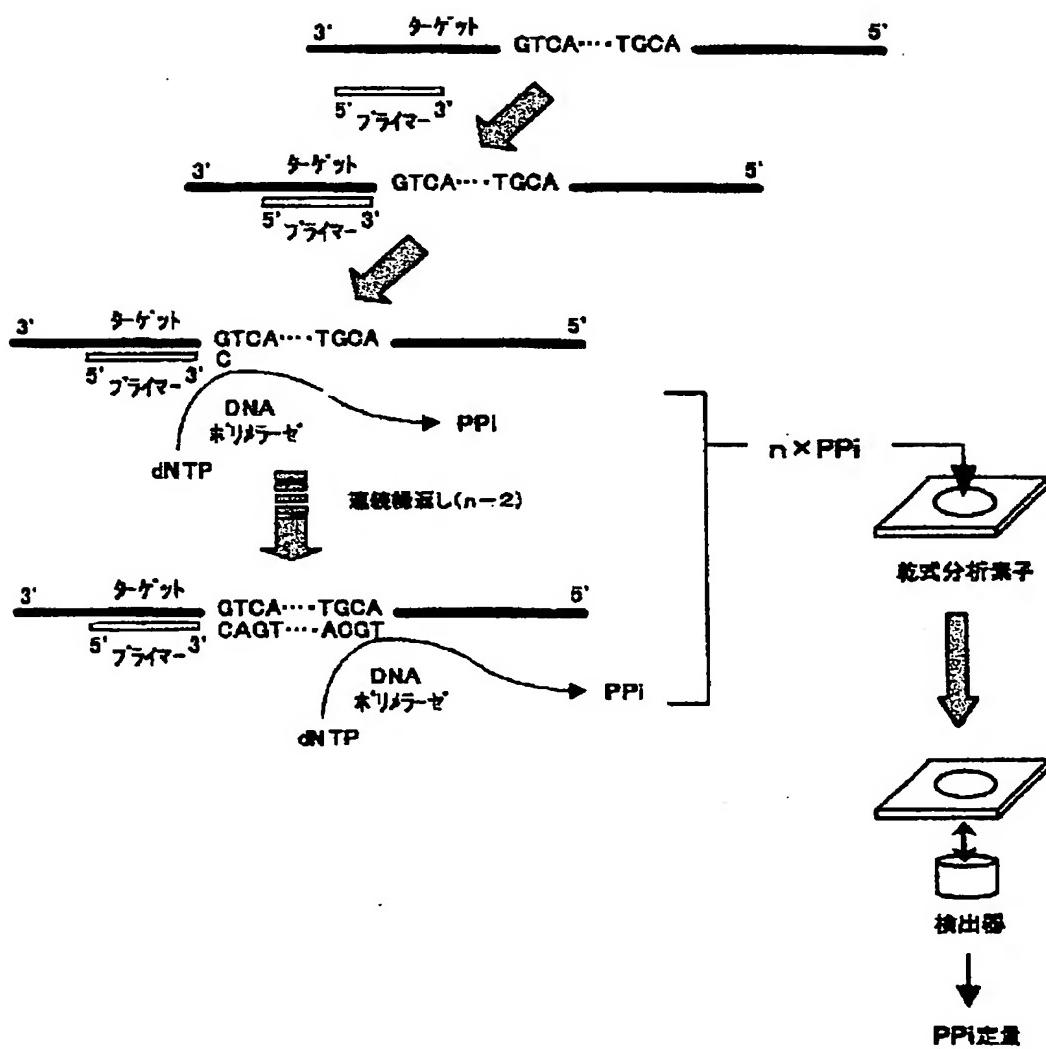
【図2】



【図5】

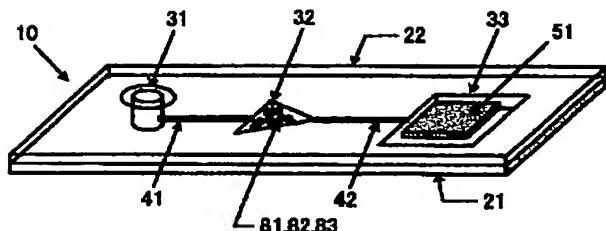


【図3】

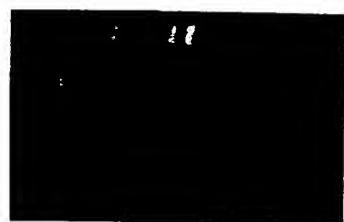


(23)

【図4】

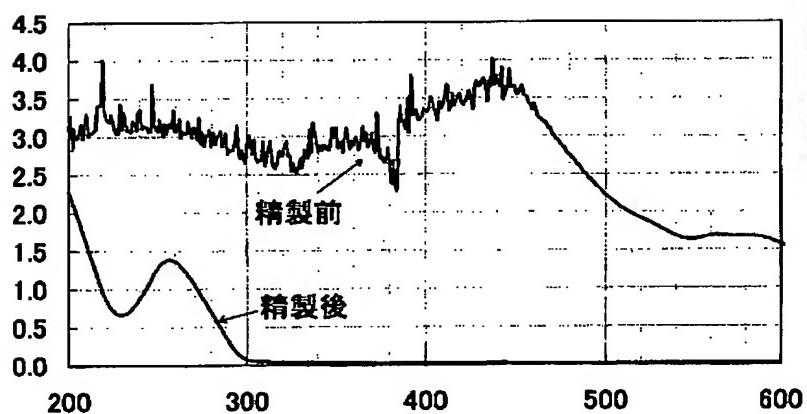


【図7】



マーカー
1)のポジコン
1)の本発明による精製品
ネガコン
2)のポジコン
2)の本発明による精製品
ネガコン

【図6】



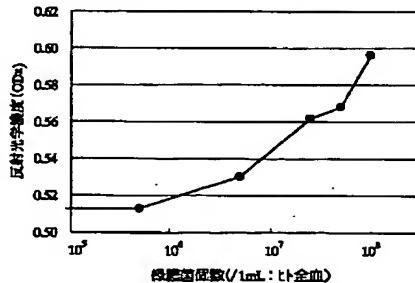
マーカー
3)のポジコン
3)の本発明による精製品
ネガコン
4)のポジコン
4)の本発明による精製品
ネガコン

【図8】

【図9】

添加した緑藻菌個数と反射光学濃度 (OD_4) の関係

| 緑藻菌個数 (/1mL : ヒト全血) | 反射光学濃度 (OD_4) |
|---------------------|-------------------|
| 0 | 0. 508 |
| 5×10^4 | 0. 513 |
| 5×10^5 | 0. 530 |
| $2. 5 \times 10^6$ | 0. 562 |
| 5×10^7 | 0. 568 |
| 1×10^8 | 0. 598 |

添加した緑藻菌個数と反射光学濃度 (OD_4) の関係

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C 12 N 15/09

C 12 Q 1/26

1/28

1/48

1/68

G 01 N 21/78

識別記号

Z N A

F I

C 12 Q 1/26

1/28

1/48

1/68

G 01 N 21/78

テマコード (参考)

4 C 0 5 7

Z

A

A

Z

A

30/26

(24)

| | | |
|-------|---------------|---------|
| 30/26 | 30/48 | T |
| 30/48 | 30/88 | E |
| 30/88 | 33/52 | A |
| 33/52 | | B |
| | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |

(72) 発明者 牧野 快彦
 埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ
 イルム株式会社内

F ターム (参考) 2G045 AA28 BA13 BB02 BB03 BB20
 BB29 BB51 CA25 CA26 CB01
 CB03 CB04 CB07 CB14 CB21
 DA12 DA13 DA14 FA18 FA29
 FB01 FB02 FB06 FB11 FB17
 GC10 GC11
 2G054 AA06 AA07 AA08 BB04 BB13
 CA20 CA22 CE02 EA04 EA05
 EB02 GA03 GB01 GB04 GE06
 4B024 AA11 CA01 CA05 HA14
 4B029 AA07 BB20 CC11 FA01 FA15
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ89
 QR02 QR03 QR06 QR08 QR32
 QR62 QR84 QS25 QS34 QX01
 QX02
 4C057 AA10 BB02 BB05 DD01 MM02
 MM04 MM08